

FCI/DE 2004/000248

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 08 APR 2004

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

 Aktenzeichen:

103 11 399.1

Anmeldetag:

13. März 2003

Anmelder/Inhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH,
52428 Jülich/DE

Bezeichnung:

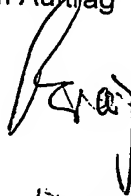

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien
codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte
Proteine sowie Verfahren zur mikrobiellen Her-
stellung von L-Serin

 IPC:

C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



B e s c h r e i b u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine sowie Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine mit reduzierter bzw. ausgeschalteter L-Serin-Dehydratase sowie Mikroorganismen und Verfahren zur Herstellung von L-Serin.

Die Aminosäure L-Serin findet in der Nahrungsmittel-, Futtermittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Humanmedizin Anwendung. Darüber hinaus dient sie als Baustein für die Synthese weiterer industriell verwertbarer Produkte, wie z. B. L-Tryptophan aus Indol und L-Serin.

Es ist bekannt, dass L-Serin durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien hergestellt werden kann. So ist z. B. ein Stamm von *Corynebacterium glycinophilum* in der Lage, L-Serin aus Glycin und Kohlenhydraten zu bilden (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada K und Okumura S (1972) Journal of General Applications in Microbiology 18: 365). An der Umsetzung von Glycin zu L-Serin ist hier das Enzym L-Serin-Hydroxymethyltransferase beteiligt (Kubota K und Yokozeki K (1989) Journal of Fermentation and Bioengineering, 67(6):387-390). Diese *Corynebacterium glycinophilum* Stämme weisen eine defekte Serindehydratase auf, die durch ungerich-

tete Mutagenese erzeugt wurde (Kubota K (1985) Improved production of L-serin by mutants of *Corynebacterium glycinophylum* with less serine dehydratase activity. Agricultural Biological Chemistry, 49:7-12). Diese Enzymaktivität ist Pyridoxal 5'-Phosphat abhängig und nicht molekular charakterisiert (Kubota K., Yokozeki K, Ozaki H. (1989) Effects of L-serine dehydratase activity on L-serine production by *Corynebacterium glycinophylum* and an examination of the properties of the enzyme. Agric. Biol. Chem 49:7-12) Aus dem US Patent 4,528,273 ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von L-Serin aus Glycin bekannt, bei dem der Mikroorganismus Serin-Dehydratase negativ ist. Weiterhin wird L-Serin fermentativ aus Methanol und Glycin unter Zuhilfenahme methyilotropher Bakterien, wie z. B. *Hyphomicrobium* Stämmen, produziert (Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shiamo M, Miyata A und Tanabe T (1993) Applied Microbiology and Biotechnology, 39: 427-432). In beiden Fällen muss die Aminosäure Glycin als Vorstufe für die Bildung der Aminosäure L-Serin eingesetzt werden. Ferner sind coryneforme Bakterien bekannt, die L-Serin direkt aus Kohlenhydraten, ohne zusätzliche Beigabe weiterer Vorstufen produzieren können. Dies ist für eine wirtschaftliche Produktion von L-Serin in industriellem Maßstab vorteilhafter, da L-Serin direkt aus Kohlenhydraten ohne aufwendige Zugabe von Vorstufen hergestellt werden kann. Diese Stämme, die zu der Gattung *Corynebacterium glutamicum* gehören, weisen sich dadurch aus, dass sie z. B. resistent gegen die L-Serin-Analoga Serin-Hydroxamat und β -Chloroalanin sind und durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurden

(Yoshida H und Nakayama K (1974) Nihon-Nogei-Kagaku-kaishi 48: 201-208).

5 Darüber hinaus sind *Brevibacterium flavum* Stämme bekannt, die durch ungerichtete Mutagenese Defekte im L-Serin-Abbau aufweisen, eine erhöhte Aktivität der durch *serA* kodierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase besitzen, und die aus *Escherichia coli* stammenden Gene *serB* und *serC* überexprimieren (EP0931833A2).

10

A
15 Es ist Aufgabe der Erfindung, Maßnahmen zur Verfügung zu stellen, die zu einer verbesserten Produktion von L-Serin oder davon ableitbaren Stoffwechselprodukten wie z. B. Tryptophan führen. Es ist somit Aufgabe der Erfindung, Nukleinsäuren bereitzustellen, die für am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine codieren, die gegenüber in Wild Typ Organismen vorkommenden Proteinen einen verringerten bzw. keinen Abbau von L-Serin zu Pyruvat aufweisen. In diesem Zusammenhang ist es weiter-
20 hin Aufgabe der Erfindung eine L-Serin-Dehydratase sowie Mikroorganismen bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden L-Serin-Dehydratase bzw. Mikroorganismen mit einer L-Serin-Dehydratase, einen verringerten Abbau von L-Serin aufweisen. Weiterhin ist es
25 Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin bereitzustellen.

30 Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 7 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 7 angegebenen Merkmalen. Die

Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 8 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 8 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 9 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 9 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 14 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 14 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 20 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 20 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 21 erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 21 angegebenen Merkmale.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, eine L-Serin-Dehydratase bereitzustellen, die einen verringerten bzw. keinen L-Serin Abbau mehr verursacht. Weiterhin ist es möglich, Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine L-Serinproduktion mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten möglich ist.

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante Nukleinsäuren, deren für die L-Serin-Dehydratase, im folgenden auch als SDA bezeichnet, codierende Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett dele-

tiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Bereitstellung von Nukleinsäuren, deren *sdaA* Gensequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird. Es erwies sich beispielsweise
- 10 se eine Nukleinsäure mit einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No 1 deren Nukleotide von Position 506 bis 918 teilweise oder komplett deletiert oder mutiert sind oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen als vorteilhaft. Weiterhin vorteilhaft kann
- 15 beispielsweise die Deletion oder Mutation des zur Bildung des Eisen-Schwefelclusters erforderliche Cystein enthaltende Sequenzmotivs sein (Hofmeister et al., (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. FEBS Letters 351: 416-418).
- 20

- Die Wild Typ L-Serin-Dehydratase (*sdaA*) Gensequenz ist
- 25 allgemein bekannt und kann den dem Fachmann bekannten Datenbanken (NCBI Accession Nr. AP005279) oder dem beigefügten Sequenzprotokoll gemäß SEQ ID No. 1 entnommen werden.

- Die vollständige Deletion des L-Serin-Dehydratase (*sdaA*)-Gens kann beispielsweise durch gerichtete rekombinante DNA-Techniken erreicht werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology
- 30

(1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des L-Serin-Dehydratase-Gens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der L-Serin-Dehydratase-Aktivität erreicht. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032AsdaA, der eine Deletion im *sdaA*-Gen trägt.

10

Um die Expression des *sdaA*-Gens zu verhindern oder eine geringere Expression zu erreichen, kann beispielsweise die Promoter- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionsregulationskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch regulierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Serinbildung zu reduzieren. Daneben ist aber auch eine Regulation der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA reduziert wird. Des weiteren können Gene verwendet werden, die für das entsprechende Enzym mit geringer Aktivität kodieren. Alternativ kann weiterhin eine reduzierte Expression des L-Serin-Dehydratase-Gens durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)).

30

bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)) und in der Patentanmeldung WO 96/15246.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum isoliert werden. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind beispielsweise,

- 10 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870;
- 15 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806;
- Corynebacterium callunae ATCC 15991;
- Corynebacterium glutamicum ATCC 13032;
- Brevibacterium divaricatum ATCC 14020;
- Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869;
- 20 Corynebacterium lilium ATCC 15990;
- Brevibacterium flavum ATCC 14067;
- Corynebacterium melassecola ATCC 17965;
- Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;
- Brevibacterium immariophilum ATCC 14068;
- 25 Brevibacterium roseum ATCC 13825;
- Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240;
- Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354;

- Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete
- 30 Mutanten oder Produktionsstämme sind, Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomicrobium, Alcaligenes oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der

10

zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

5 Unter einer Nukleinsäure oder einem Nukleinsäurefrag-
ment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA
zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann
und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modi-
fizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann.
Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genom-
10 sche DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell Äquiva-
lente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nukleotid-
sequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequen-
15 zen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender
Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerie-
rung des genetischen Codes bedingt noch die gewünschten
Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen
somit natürlich vorkommende Varianten der hierin be-
20 schriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch
chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den
Kodongebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nukleotid-
sequenzen.

25 Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man ins-
besondere auch natürliche oder künstliche Mutationen
einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin
die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen
Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen
30 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste.
Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen,
die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch kon-
servierter Aminosäuren führen können, welche aber zu

keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen..

Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nukleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridi-

sieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfasst erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

10

Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

20

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur, enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern.

25

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art, mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur In-

30

13

tegration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art enthalten.

- Als Vektoren eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden wie z. B. pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688), pEKEx2 (Eikmanns et al., *Gene* 102: 93-98 (1991), oder pXMJ19 (Jacoby M., Burkowski A (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol. Technique* 13: 437-441). Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden. Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht limitierend.
- 15 Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt coryneformen Bakterien zu
- 20 amplifizieren und isolieren.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidse-
- 25
- 30

14

- quenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine L-Serin-Dehydratase mit gegenüber der Wild Typ L-Serin-Dehydratase verringertem L-Serinabbau, codiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder deren Variationen der zuvor beschriebenen Art. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine L-Serin-Dehydratase, bzw. ein L-Serin-Dehydratase Mutein, mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 2 deren Aminosäuren von Position 135 bis 274, beispielsweise als Folge einer gerichteten Mutagenese auf DNA-Ebene, verändert wurden oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon oder Mischungen daraus.
- Unter „verändert“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das komplette oder teilweise Entfernen oder Austauschen der Aminosäuren von Position 135 bis 274 verstanden.
- Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

15

Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N-Terminus oder C-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

10

Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, besonders bevorzugt der Art *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium* besonders bevorzugt aus *Corynebacterium glutamicum* stammen. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind beispielsweise

15

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870;

20

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806;

Corynebacterium callunae ATCC 15991;

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032;

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020;

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869;

25

Corynebacterium lilium ATCC 15990;

Brevibacterium flavum ATCC 14067;

Corynebacterium melassecola ATCC 17965;

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068;

30

Brevibacterium roseum ATCC 13825;

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240;

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354;

Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomicrobium, Alcaligenes oder Klebsiella.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, dass die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

- 15 Die Erfindung betrifft weiterhin einen Mikroorganismus, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das sdaA-Gen in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder
20 gegenüber den natürlich vorkommenden sdaA-Genen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

- 25 Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.

- 30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid der zuvor beschriebenen Art, welches im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus einen verringerten bzw. keinen L-Serin Abbau aufweist.

A7

Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, dass er ein coryneformes Bakterium, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum ist.

Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von sogenannten Defekt-Mutanten des zu untersuchenden Organismus, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens oder entsprechenden Proteins aufweisen. Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der Mutante und weitgehende Wiederherstellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder Genfragmente aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus erreicht wird.

Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten bzw. von Mutanten mit einer reduzierten oder ausgeschalteten L-Serin-Dehydratase, ist

18

beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B.

N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung.

Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind all-

- 5 gemein bekannt und können unter anderem bei Miller
 (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder
 im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology"
10 der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

- Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, wobei
15 bei die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleinsäure in einem Mikroorganismus in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleinsäuren gar nicht oder geringer exprimiert wird, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus
20 zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin eingesetzt wird und das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

- Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten
25 Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Serin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im
30 Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren

19

und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden natriumhaltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstoffsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können

überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- 5 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.
- 10 Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrecht zu erhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Serin gebildet hat. Dieses
- 15 Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- Die Analyse der L-Serin-Bildung kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin
- 25 Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

30

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Serin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

M

- Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Vertreter coryneformer Bakterien handeln. Eine Auswahl an Ergebnissen der Fermentation ist in Tabelle 1 dargestellt. Hierbei zeichnen sich die erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine wesentlich verbesserte L-Serin-Produktion gegenüber den entsprechend nicht transformierten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, daß *C. glutamicum* ATCC 13032ApanBCAsdaA zu einer wenigstens 4-fachen Steigerung der L-Serin Akkumulation im Medium im Vergleich zu den Kontrollstämmen führt (Tab. 1). Durch die gemeinsame Überexpression weiterer Gene, die positiv auf den L-Serinbiosyntheseweg wirken, konnte eine 16-fache Steigerung der L-Serin-Produktion erreicht werden.
- Unter Aminosäure-Produktionsstämmen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung *Corynebacterium glutamicum*-Stämme oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, dass ihr Stoffwechselfluss verstärkt in die Richtung der Biosynthese von Aminosäuren oder deren Abkömmlingen verläuft (metabolic engineering). Beispielsweise sind bei diesen Aminosäure-Produktionsstämmen ein oder mehrere Gen(e) und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vorliegende Erfindung umfasst hierbei sämtliche bereits

bekannte Aminosäure-Produktionsstämme, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme umfaßt, die der Fachmann in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Mikroorganismen, beispielsweise Enterobakterien, Bacillaceen oder Hefe-Arten nach gängigen Methoden herstellen kann.

Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide sowie experimentelle Ergebnisse nach Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. Mikroorganismen

Es zeigt:

Fig. 1: Intergrationsplasmid pK19mobsacB-DeltasdaA
Die am äußeren Rand des Plasmids angegebenen Markierungen kennzeichnen die jeweiligen Restriktionsschnittstellen. Die im Inneren des Kreises angegebenen Abschnitte kennzeichnen folgende Gene:

kan	Kanamycinresistenz
sacB	Sucrase
oriT	Transfer-Origin
sda ⁺	5'-Ende des sdaA Gens
sda ⁻	3'-Ende des sdaA Gens

Fig. 2: Wachstumsverhalten (quadratische Symbole) und L-Serin-Abbau (kreisförmige Symbole) von *C. glutamicum* 13032ΔpanBCΔsdaA, Klon 1 (□, ○) und *C. glutamicum* 13032ΔpanBCΔsdaA, Klon 2 (■, ●) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032ΔpanBC, Klon 1 (□, ○) und *C. glutamicum* 13032ΔpanBC, Klon 2 (■, ●). Die Abszisse x

23

gibt die Fermentationszeit in Stunden [h] an.
Die Ordinate Y_1 gibt das Wachstum der Mikroorganismen gemessen als optische Dichte (OD) bei 600 nm an. Die Ordinate Y_2 gibt die L-Serinkonzentration in mM an.

Fig. 3: Expressionsplasmid pEC-T18mob2-serA^{fbr}CB.

Die am äußeren Rand des Plasmids angegebenen Markierungen kennzeichnen die jeweiligen Restriktionsschnittstellen. Die im Inneren des Kreises angegebenen Abschnitte kennzeichnen folgende Gene:

SerC	Phosphoserin Transaminase
SerB	Phosphoserin Phosphatase
Rep	Replikationsursprung
Per	Partition Zellverteilungsgen
Tet	Tetracyclinresistenzgen
RP4-mob	Mobilisationsursprung
oriV	Ursprung der DNA Replikation
SerA-fbr	3-Phosphoglycerat Dehydrogenase

Ausführungsbeispiele:

1. Konstruktion einer sdaA-Deletionsmutante von *C. glutamicum* ATCC13032 ΔpanBC

Corynebacterium glutamicum verfügt über eine Nukleotidsequenz (Genbank-Accession-Nummer BAB99038; SEQ-ID-No. 1) dessen abgeleitete Polypeptid-Sequenz 40 % Identität zur beschriebenen L-Serin-Dehydratase von *E. coli* aufweist (NCBI-Accession-Nummer P16095). Durch gezielte Mutagenese nach einer Methode von Link et al. (Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating

precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J Bacteriol. 1997

- Oct;179(20):6228-37) und Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) wurde das *sdaA*-Gen von *C. glutamicum* deletiert. Hierzu wurden folgende Primer von der corynebacteriellen *sdaA*-Sequenz (NCBI Accession-Nummer AP005279) abgeleitet:

10 *sdaA*-1: 5'-TCGTGCAACTTCAGACTC-3'
(AP005279 Nukleotid 73635 - 73653);

sdaA-2: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACACGTCATAATGAACCCACC-3'
(AP005279 komplementär zu Nukleotid 74121-74139);

15 *sdaA*-3: 5'-TGTTTAAGTTTACTGGATGGCCGACTAATGGTGCTGCG-3'
(AP005279 komplementär zu Nukleotid 74553 - 74571);

sdaA-4: 5'-CGGGAAGCCCAAGGTGGT-3'
20 (AP005279 Nukleotid 75044 - 75062)

- Primer *sdaA*-1 und *sdaA*-2 flankieren jeweils den Beginn und das Ende des *sdaA*-Gens. Die Primer *sdaA*-2 und *sdaA*-3 verfügen über jeweils komplementäre Linker-Regionen (hervorgehobener Text), die es ermöglichen in einem zweistufigen PCR-Ansatz (Cross-over PCR) eine Deletion in dem *sdaA*-Gen in vitro zu erzeugen. In einer ersten PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* wurden jeweils die Primer-Kombinationen *sdaA*-1 und *sdaA*-2 sowie *sdaA*-3 und *sdaA*-4 eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 µM Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 600 nM der entsprechenden Oligonukleotide *sdaA*-1 und
- 25
30

25

sdaA-4 sowie 60 nM der Oligonukleotide sdaA-2 und sdaA-3, 100 ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden und 72°C für 40 Sekunden. Der Elongationsschritt bei 72°C wurde nach 10 Zyklen um 5 Sekunden pro Zyklus verlängert. Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-Fragmente, die jeweils eine Länge von 500 bp aufwiesen mit dem QIAExII Gelextraktionskit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, und beide Fragmente wurden als Template in die zweite PCR eingesetzt. Als Primer wurden nun die Primer sdaA-1 und sdaA-4 eingesetzt. Diesmal erfolgte die Reaktion in 35 Zyklen in Gegenwart von 200 µM Deoxynukleotidtriphosphaten, je 600 nM des entsprechenden Oligonukleotids, jeweils 20 ng der isolierten Template-DNA aus der ersten PCR, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten der Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung unter folgenden Bedingungen: 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden und 72°C für 80 Sekunden. Wiederum wurde der Elongationsschritt nach 10 Zyklen um jeweils 5 Sekunden verlängert. Nach der PCR-Reaktion wurde das erhaltene 1000 bp lange DNA-Fragment, dass nun das inaktivierte sdaA-Gen mit einer 420 bp langen zentralen Deletion beinhaltet, aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, und blunt-end mit Hilfe des Sure Clone-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) in die *Sma*I-Schnittstelle des Inaktivierungsvektors pK19mobsacB

- (Schäfer et al. Gene 145: 69-73 (1994), der nur in *E. coli*, nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann, kloniert. Das erhaltene Plasmid pK19mobsacB_AsdaA (Fig. 1) wurde durch Restriktionskartierung auf Richtigkeit überprüft. Die Klonierung erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649).
- Anschließend wurde das Plasmid durch Elektroporation in *C. glutamicum* 13032ApanBC (Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, Krumbach K, Sahm H, Eggeling L. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 2002 68(5):2246-50) eingebracht und auf Integration des Vektors selektioniert. Dieser Stamm ist durch die Deletion der Pantothenat-Biosynthese Gene *panB* und *panC* Pantothenat-auxotroph, und zeichnet sich dadurch aus, dass er unter Pantothenat-Limitation aufgrund einer verstärkten Akkumulation von Pyruvat ca. 50 mM Alanin und 8 mM Valin ausscheidet. Darüber hinaus bildet der Stamm ca. 100 μ M L-Serin und eignet sich somit als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines L-Serinproduzenten. Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* 13032ApanBC erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/ 10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology

174: 5462-5465). Zwei dieser Klone, deren Nukleotide
des *sdaA*-Gens von Position 506 bis 918 deletiert waren
und fortan mit 13032ApanBCAsdaA, Klon 1 und
13032ApanBCAsdaA, Klon 2 bezeichnet werden, wurden für
5 die weiteren Untersuchungen verwendet.

2. Einfluss der *sdaA*-Deletion auf den L-Serin-Abbau

Im Folgenden wurde getestet, ob das deletierte *sdaA*-Gen
10 tatsächlich am L-Serin-Abbau beteiligt ist. Hierzu wur-
de ein Wachstumsexperiment mit jeweils zwei Klonen des
Stamms *C. glutamicum* 13032ApanBCAsdaA im Vergleich zum
Stamm *C. glutamicum* 13032ApanBC auf Minimalmedium
(Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993)
15 5595-5603) das zusätzlich 2 % Glucose, 1 µM Pantothenat
und 100 mM L-Serin enthielt durchgeführt. Es wurde das
Wachstum und der Verbrauch von L-Serin verfolgt. Das
Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt.

20 Das Ergebnis in Fig. 2 zeigt, dass die Deletion des
sdaA-Gens zu einem ca. 40 % verringerten Abbau von
L-Serin führt.

25 3. Einfluss der Deletion des *sdaA*-Gens auf die L-Serin- Bildung

Um zu testen, welchen Einfluss die Deletion des
L-Serin-Dehydratase-Gens auf die L-Serin-Bildung hat,
30 wurden die Stämme 13032ApanBCAsdaA (Klon 1, Klon 2) und
13032ApanBC (Klon 1, Klon 2) mit dem Plasmid
pEC-T18mob2-*serA*^{thr}*serCserB* transformiert. Das Plasmid
(Fig. 3) setzt sich zusammen aus dem Vektor pEC-T18mob2

(Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Gotker, S., Puhler, A. and Kalinowski, J. Efficient Electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a Mini-Replicon Derived from the *Corynebacterium glutamicum* Plasmid pGal. Curr. Microbiol. 45 (5), 362-367 (2002)),
5 den corynebacteriellen Genen *serA^{fbx}* (Peters-Wendisch P., Netzer R, Eggeling L, Sahm H. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is
10 required for inhibition by L-serine. Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Dec;60(4):437-41), sowie *serC* und *serB* (deutsche Patentanmeldung 100 44 831.3, 11.09.2000).
Nach erfolgter Elektroporation wurden die Stämme
13032ApanBCAsdaApserA^{fbx}CB und 13032ApanBCpserA^{fbx}CB er-
15 halten. Zur Untersuchung der L-Serinausscheidung wurden die zwei Stämme 13032ApanBCAsdaApserA^{fbx}CB und
13032ApanBCpserA^{fbx}CB in Komplexmedium (CgIII mit 2% Glukose und 5 µg/l Tetracyclin) gezüchtet, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-
20 5603) jeweils aus den Vorkulturen beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 50 µg/l Kanamycin und 1 µM Pan-
tothenat. Als Kontrolle wurden die beiden Ausgangsstämme 13032ApanBC und 13032ApanBCAsdaA in gleicher Weise
kultiviert, allerdings enthielten die Medien kein
25 Tetracyclin b. Es wurden je mindestens zwei unabhängige Fermentationen durchgeführt. Nach Kultivierung für 30
Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte L-Serinmenge be-
stimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J
30 Chromat (1983) 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 1 dargestellt, und es zeigt sich, daß das Ausschalten der L-Serin-Dehydratase zu einer 4-

fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Medium führt, unabhängig davon, ob die L-Serin-Biosynthesegene *serA^{thr}*, *serC* und *serB* überexprimiert werden. Die Überexpression der L-Serin-Biosynthesegene *serA^{thr}*, *serC* und *serB* führt jedoch generell zu einer 16-fachen Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Kulturüberstand. Somit stellt die Nutzung der konstruierten und beschriebenen Deletionsmutante *AsdaA* ein Verfahren dar, um die L-Serinbildung entscheidend zu verbessern.

10

Tabelle 1: Akkumulation von L-Serin im Kulturüberstand von *Corynebacterium glutamicum* 13032ApanBC und 13032ApanBCAsdaA nach Expression der Gene *serA^{thr}*, *serC* und *serB*.

15

Stamm	OD ₆₀₀	L-Serin [mM]
13032ApanBC	40	0,1
13032ApanBCAsdaA	42	0,4
13032ApanBCpserA ^{thr} CB	30	1,6
13032ApanBCAsdaApsrA ^{thr} CB	30	6,6

4. Bestimmung der L-Serin-Dehydratase-Aktivität

Zur Bestimmung der L-Serin Dehydratase-Aktivität wurde der Wildtypstamm WT pXMJ19 (Jacoby M., Burkovski A (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. Biotechnol. Technique 13: 437-441), der Überexpressionsstamm WT pXMJ19_sdaA und der Deletionsstamm *AsdaA* pXMJ19 in CgXII-Minimalmedium wie bei Keilhauer et al., (1993) beschrieben angezogen. Das Medium enthielt 30 mg/l Protokatechusaure, 100 mM Glu-

kose und 100 mM L-Serin. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 6-8, gemessen am Spektralphotometer Pharmacia Biotech ultrospec 3000, geerntet. Anschließend wurden sie 10 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert, in 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0) resuspendiert, und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0), 1 mM FeSO₄ und 10 mM Dithiothreitol aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Branson sonifier 250; duty cycle 25%, output control 2,5, 10 Minuten) auf Eis. Zur Bestimmung der L-Serin Dehydratase-Aktivität enthielt der Reaktionsansatz 50 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (pH 8,0), 10 mM Dithiothreitol und 10-100 µl Rohextrakt. Der Nachweis des aus dem Serin gebildeten Pyruvats erfolgte wie beschrieben (Ohmori et al., 1991). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM L-Serin gestartet und nach 10 Minuten durch Zugabe von 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol Reagenz im Verhältnis 1:1 gestoppt. Das Reagenz bestand, wie bei Ohmori et al., 1991 beschrieben, aus 4 mg 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzol in 42,4 ml H₂O, 3,5 ml β-Mercaptoethanol und 4,1 ml HCl (37%ig) gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 102°C trockener Hitze. Der Nachweis und die Quantifizierung des aus dem Pyruvat entstandenen 2-Hydroxy-6,7-dimethoxy-3-methylquinoxalin-Derivats erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie, ebenfalls wie beschrieben (Ohmori et al., 1991). Die Proteinbestimmung im Rohextrakt erfolgte mittels eines auf der Bradford-

31

Methode (Bradford, 1976) beruhenden Protein Assays (Fa. Bio-Rad). Die ermittelten spezifischen L-Serin Dehydratase-Aktivitäten der drei Stämme sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Spezifische Aktivität der L-Serin Dehydratase in den Stämmen 13032 WT pXMJ19_sdaA (Überexprimierer), 13032 WT pXMJ19 (Wildtyp mit Leervektor) und 13032 Δ sdaA pXMJ19 (Deletionsmutante mit Leervektor) unter induzierenden Bedingungen.

C. glutamicum Stamm	spez. Aktivität [nmol/min*mg]
13032 WT pXMJ19_sdaA	0,221
13032 WT pXMJ19	0,003
13032 Δ sdaA pXMJ19	0

P a t e n t a n s p r ü c h e

-
1. In Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante Nukleinsäuren,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleotidsequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.
- 10 2. Nukleinsäuren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass die *sdaA*-Gensequenz in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar
15 nicht exprimiert wird.
3. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 2,
gekennzeichnet durch eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No 1, deren Nukleotide von Position 506 bis 918 komplett oder teilweise deletiert oder mutiert
20 sind oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen.
4. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass sie aus coryneformen Bakterien isoliert werden.
5. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* isoliert werden.

6. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* isoliert werden.
7. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
- 10 8. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 6 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 7 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
- 15 9. L-Serin-Dehydratase mit reduzierter L-Serin-Dehydrataseaktivität, codiert durch eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 20 10. L-Serin-Dehydratase nach Anspruch 9, mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 2 deren Aminosäuren von Position 135 bis 274 verändert sind, oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
- 25 11. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus coryneformen Bakterien stammt.
12. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* stammt.

13. L-Serin-Dehydratase gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12,

5 dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* stammt.

14. Mikroorganismus

dadurch gekennzeichnet,

10 dass die für eine L-Serin-Dehydratase codierende Nukleotidsequenz, in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

15 15. Mikroorganismus nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,
dass das *sdaA*-Gen in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert ist oder gegenüber den natürlich vorkommenden *sdaA*-Genen geringer oder gar nicht exprimiert wird.

20

16. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 15, enthaltend in replizierbarer Form eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, eine Genstruktur gemäß Anspruch 7, einen Vektor gemäß Anspruch 8 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13.

25

17. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet,
dass er ein coryneformes Bakterium ist.

18. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass er zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört. 5
19. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass er zu *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* gehört. 10
20. Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligten Proteinen; dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. 15
21. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) die für die L-Serin-Dehydratase codierende Nukleinsäure in einem Mikroorganismus in Teilen oder komplett deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natürlich vorkommenden Nukleinsäuren gar nicht oder geringer exprimiert wird, 20
- b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt a) zur mikrobiellen Herstellung eingesetzt wird und 25
- c) das gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die sdaA-Gensequenz in Teilen oder komplett
deletiert oder mutiert wird oder gegenüber natür-
lich vorkommenden Nukleotidsequenzen geringer oder
gar nicht exprimiert wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Nukleotide gemäß SEQ ID No 1 von Position
506 bis 918 komplett oder in Teilen deletiert oder
mutiert werden oder gegenüber natürlich vorkommen-
den Nukleotidsequenzen geringer oder gar nicht
exprimiert werden.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass Mikroorganismen aus der Gruppe Corynebacteri-
um, Brevibacterium, Arthrobacter, Pseudomonas, No-
cardia, Methylobacterium, Hyphomicrobium, Alcalige-
nes oder Klebsiella eingesetzt werden.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1
bis 6, eine Genstruktur gemäß Anspruch 7 oder ein
Vektor gemäß Anspruch 8 eingesetzt wird.

37

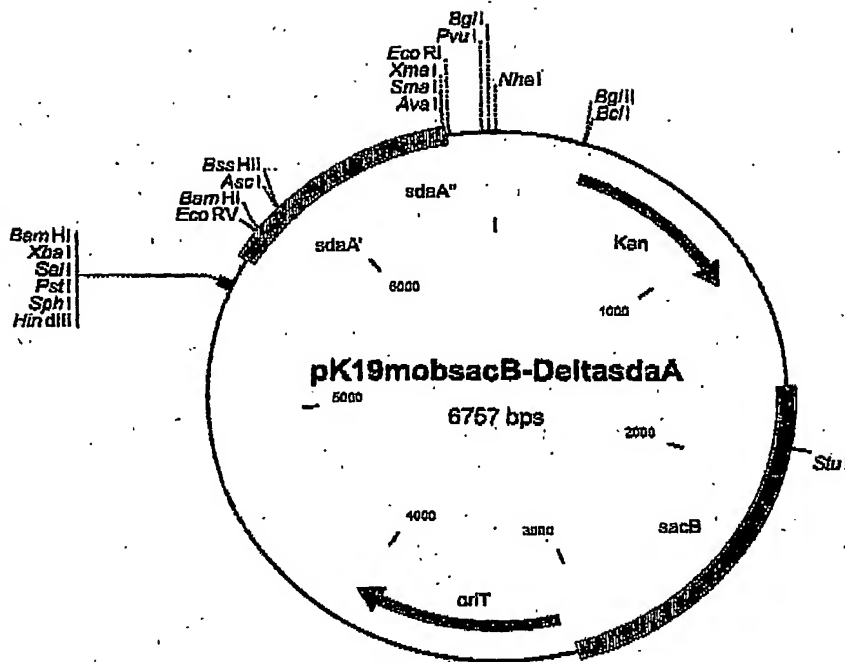


Fig. 1

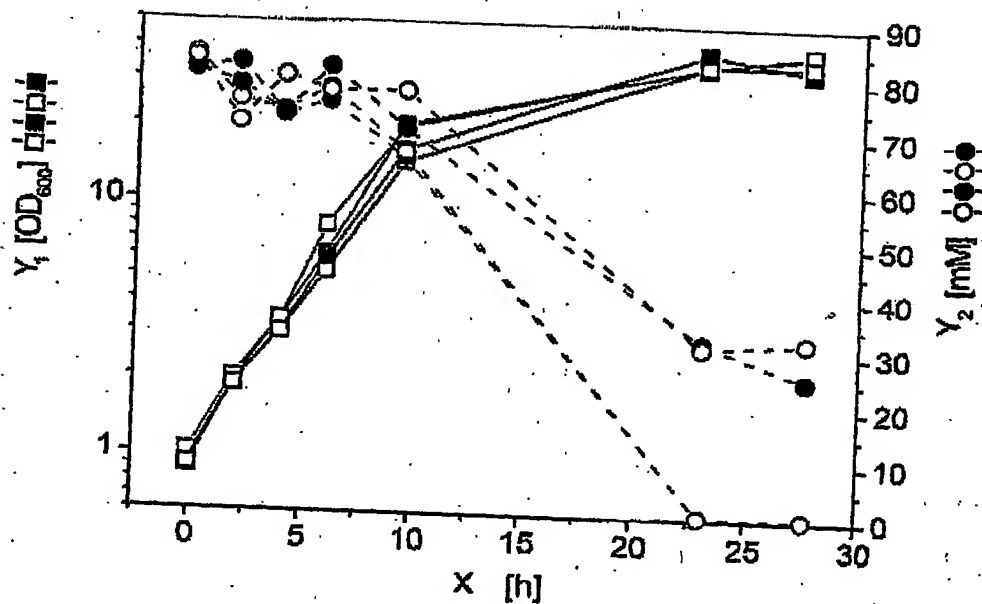


Fig. 2

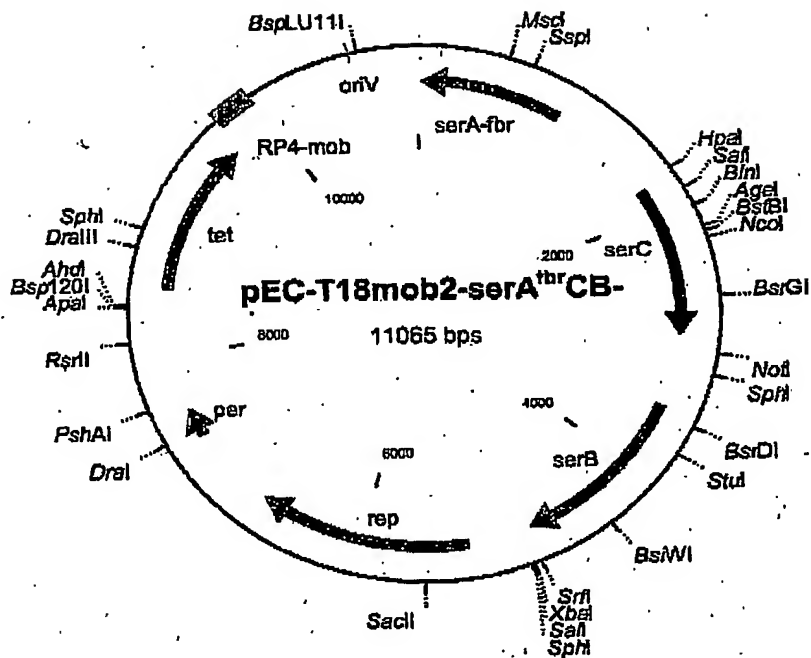


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin

<130> PT 1.2057

<140>

<141>

<150> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1449

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

```

tcgtgcaact tcagactctt acggaggcga tggaccacaaa acaactacaa tcaagcagat 60
caccttgtag accaccatag aaaaggccca ccttcagcca tggctatcag tgttggtgat 120
ctatttagca tcggtatcgg accatcatcc tcacataccg tcggcccat gagagccgcc 180
ctcacgtata tctctgaatt tcccagctcg catgtcgata tcaagttgca cggatccctt 240
gcggccaccg gtaaaaggcca ctgcactgac cggggcggtat tactgggtct ggtgggatgg 300
gaaccaacga tagttcccat tgatgctgca ccttcaccog gggggccgat tctgcgaaa 360
ggttctgtga acggggccaaa gggaaagggtg tcgtattccc tgacgtttga tctcctcct 420
cttcagaac accccaatgc cgttacctt aaaggatcaa ccacaaggac ttatttgcg 480
gtgggtgggt ggttcattat gacgttggag gatctccgga agctggacga tatcgatca 540
ggtgtgtcaa ccattcatcc agaggcagag gtgccttgc cttttcagaa gattcccaa 600
ttactcgcat atggtcgcga ttttgcggag gtcataaagg ataatgagcg cttaatcac 660
ggggatcttg gcacagtggg tgcctatttg gatcgagtgt ggcagattat gcaggagtgc 720
gtggcacaag gcacgcgaac gccggggatt ttaccgggtg ggttgaatgt gcaacgtcgg 780
gcggcgccag tacacgcgct gattagcaac ggggatacgt gtgagctggg tgcgtatctt 840
gatgctgtgg agtgggtgaa tctgtacgcc ctggcggtga atgaagaaa cggcgctggt 900
ggtcgtgtgg ttaactgctc gactaatggt gctgggggga ttattccggc ggtgatgcac 960
tatgcgcggg attttttgac aggttttggg gcggagcagg cgcggacgtt tttgtatacc 1020
gcgggtgcgg tgggcatcat cattaaggaa aatgcctcga tctctggcgc ggaggtgggg 1080
tgtcagggtg aggttgggtt agcgtccgcg atggcggtcg cggggttgtg tgcagtctta 1140
gggtggtctc cgcaacagggt ggaaaacgcc gcggagattg cgttggagca caatttggga 1200
ttgacgtgcg atccgggtggg cgggttagtg cagattccgt gtattgaacg caacgctatt 1260
gctgccatga agtccatcaa tgcggcaagg cttgcccggg ttggtgatgg caacaatcgg 1320
gtgagtttgg atgatgtggt ggtcacgatg gctgccaccg gccgggacat gctgaccaa 1380
tataaggaaa cgtcccttgg tggtttggca accaccttgg gcttccgggt gtcgatgacg 1440
gagtgttag

```

1449

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

Met Ala Ile Ser Val Val Asp Leu Phe Ser Ile Gly Ile Gly Pro Ser
1 5 10 15

Ser Ser His Thr Val Gly Pro Met Arg Ala Ala Leu Thr Tyr Ile Ser
20 25 30

Glu Phe Pro Ser Ser His Val Asp Ile Thr Leu His Gly Ser Leu Ala
35 40 45

Ala Thr Gly Lys Gly His Cys Thr Asp Arg Ala Val Leu Leu Gly Leu
50 55 60

Val Gly Trp Glu Pro Thr Ile Val Pro Ile Asp Ala Ala Pro Ser Pro
65 70 75 80

Gly Ala Pro Ile Pro Ala Lys Gly Ser Val Asn Gly Pro Lys Gly Thr
85 90 95

Val Ser Tyr Ser Leu Thr Phe Asp Pro His Pro Leu Pro Glu His Pro
100 105 110

Asn Ala Val Thr Phe Lys Gly Ser Thr Thr Arg Thr Tyr Leu Ser Val
115 120 125

Gly Gly Gly Phe Ile Met Thr Leu Glu Asp Phe Arg Lys Leu Asp Asp
130 135 140

Ile Gly Ser Gly Val Ser Thr Ile His Pro Glu Ala Glu Val Pro Cys
145 150 155 160

Pro Phe Gln Lys Ser Ser Gln Leu Leu Ala Tyr Gly Arg Asp Phe Ala
165 170 175

Glu Val Met Lys Asp Asn Glu Arg Leu Ile His Gly Asp Leu Gly Thr
180 185 190

Val Asp Ala His Leu Asp Arg Val Trp Gln Ile Met Gln Glu Cys Val
195 200 205

Ala Gln Gly Ile Ala Thr Pro Gly Ile Leu Pro Gly Gly Leu Asn Val
210 215 220

13.03.03

14:43

RPA -> DPA MÜNCHEN

17.7.20

Gln Arg Arg Ala Pro Gln Val His Ala Leu Ile Ser Asn Gly Asp Thr
225 230 235 240

Cys Glu Leu Gly Ala Asp Leu Asp Ala Val Glu Trp Val Asn Leu Tyr
245 250 255

Ala Leu Ala Val Asn Glu Glu Asn Ala Ala Gly Gly Arg Val Val Thr
260 265 270

Ala Pro Thr Asn Gly Ala Ala Gly Ile Ile Pro Ala Val Met His Tyr
275 280 285

Ala Arg Asp Phe Leu Thr Gly Phe Gly Ala Glu Gln Ala Arg Thr Phe
290 295 300

Leu Tyr Thr Ala Gly Ala Val Gly Ile Ile Ile Lys Glu Asn Ala Ser
305 310 315 320

Ile Ser Gly Ala Glu Val Gly Cys Gln Gly Glu Val Gly Ser Ala Ser
325 330 335

Ala Met Ala Ala Ala Gly Leu Cys Ala Val Leu Gly Gly Ser Pro Gln
340 345 350

Gln Val Glu Asn Ala Ala Glu Ile Ala Leu Glu His Asn Leu Gly Leu
355 360 365

Thr Cys Asp Pro Val Gly Gly Leu Val Gln Ile Pro Cys Ile Glu Arg
370 375 380

Asn Ala Ile Ala Ala Met Lys Ser Ile Asn Ala Ala Arg Leu Ala Arg
385 390 395 400

Ile Gly Asp Gly Asn Asn Arg Val Ser Leu Asp Asp Val Val Val Thr
405 410 415

Met Ala Ala Thr Gly Arg Asp Met Leu Thr Lys Tyr Lys Glu Thr Ser
420 425 430

Leu Gly Gly Leu Ala Thr Thr Leu Gly Phe Pro Val Ser Met Thr Glu
435 440 445

Cys

Z u s a m m e n f a s s u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für
am L-Serinstoffwechsel beteiligte Proteine sowie Ver-
fahren zur Herstellung von L-Serin

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer
Bakterien codierend für am L-Serinstoffwechsel betei-
ligte Proteine mit reduzierter bzw. ausgeschalteter
5 L-Serin-Dehydratase sowie Mikroorganismen und Verfahren
zur Herstellung von L-Serin.